

RECHERCHES SUR LA LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE *PYRICULARIA ORYZAE* CAV.

IV. — Influence du pH sur l'aptitude de germes antagonistes à inhiber *in vitro* la croissance mycélienne du parasite

par A.A. SY*, K. NORNG*, L. ALBERTINI* et M. PETITPREZ*

RÉSUMÉ. — Nous avons examiné l'influence du pH sur l'aptitude de dix neuf germes antagonistes à inhiber la croissance mycélienne de *Pyricularia oryzae* Cav. Parmi ces germes, trois champignons (*Trichoderma harzianum* (CPO/80), *T. koningii* (N70), *Fusarium* sp. (C 302 G)) et deux bactéries ((CS/Cl2) et (PTZ)) maintiennent une excellente pression de sélection à chacun des trois pH expérimentés (4,1; 6,2; 7,2). *Trichoderma pseudokoningii* (N69) et *Aspergillus niger* montrent une activité inhibitrice nettement supérieure à 60 % à pH 4,1 et 6,2. Parmi les douze autres microorganismes, onze sont responsables d'une inhibition de croissance supérieure à 50 % uniquement notée à pH 4,1, le douzième (*Drechslera oryzae*) n'étant qu'un antagoniste médiocre aux trois pH expérimentés.

SUMMARY. — The ability of nineteen microorganisms to inhibit the mycelium growth of *Pyricularia oryzae* has been studied at three pH values : 4,1; 6,2 and 7,2. Three fungi (*Trichoderma harzianum* (CPO/80), *T. koningii* (N70), *Fusarium* sp. (C302 G)) and two bacteria ((CS/Cl2) and (PTZ)) markedly inhibit the mycelium growth of the pathogen at the three experimented pH. *Trichoderma pseudokoningii* (N69) and *Aspergillus niger* are efficient (inhibition > 60 %) at pH 4,1 and 6,2. Among the twelve other microorganisms, eleven are efficient but only at pH 4,1.

MOTS CLEFS : *Pyricularia oryzae*, antagonisme, pH.

INTRODUCTION

L'inhibition *in vitro* de la croissance mycélienne de champignons phytopathogènes par des microorganismes antagonistes est apparue, à différents auteurs, nettement dépendante du pH. Aux observations déjà anciennes d'AYTOUN (1953) (confrontation de *Trichoderma* spp. avec *Armillariella mellea*) ou plus récente de DENNIS et WEBSTER (1971) (confrontation de différents *Trichoderma* avec *Homes annosus* (Fr.) Cooke, *Fusarium oxysporum* Schlecht., *Py-*

* Laboratoire de Cytologie et de Pathologie Végétales, École Nationale Supérieure Agronomique - 145, avenue de Muret, 31076 Toulouse Cédex, France.

thium ultimum Trow. et *Rhizoctonia solani* Kühn), ajoutons quelques résultats d'observations de ces dernières années.

C'est ainsi que le taux d'inhibition de la croissance mycélienne d'*Helminthosporium turcicum* Pass., parasite du maïs, par *Trichoderma viride* Pers.:Fr. (confrontation directe en milieu gélosé à 25°C) s'abaisse de 57 % à 12 % lorsque le pH d'expérimentation passe de 4,4 à 7,0 (MICKALA-DOUKAGA, ALBERTINI et PETITPREZ, 1978). Ainsi encore, dans une série d'expériences non publiées, NORNG, ALBERTINI et SY (1981) ont noté que l'efficacité antagoniste de plusieurs champignons et bactéries saprophytiques sur la croissance de différents champignons phytopathogènes capables de mener une vie saprophytique et/ou de se conserver dans le sol (*Eutypa armeniaca*, *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc., *Sclerotinia* sp., *Stereum hirsutum* (Willd.:Fr.) Fr. et *Verticillium* sp.) est étroitement conditionnée, entre autres, par le facteur pH.

Sur *Pyricularia oryzae* Cav., très important pathogène responsable du blast du riz, qui est actuellement l'objet, dans notre laboratoire, d'un important programme de recherche en lutte biologique, nous disposons de résultats d'effet du pH sur l'action antagoniste de trois champignons (*Chaetomium globosum* Kunze:Fr. (N 76/1), *Myrothecium verrucaria* (Alb. et Schw.) Ditmar (N 76/1), *Trichoderma viride* (N 76/5)). Ainsi, lorsque le pathogène est directement confronté à *T. viride* (N 76/5) ou confronté à l'excrétion antibiotique de *M. verrucaria* (N 76/1) ou de *C. globosum* (N 76/1) sur milieu solide à 25°C, le pH 3,5-3,7 est plus favorable à l'activité inhibitrice de ces antagonistes que le pH 5,6-6,2 (86 % d'inhibition à pH 3,5 contre 46 % à pH 5,6 au bout de 7 jours de confrontation avec *T. viride* (N 76/5); 39 % contre 21 % et 16 % contre 11 % respectivement par *M. verrucaria* (N 76/1) et *C. globosum* (N 76/1) au bout de 5 jours d'action antibiotique). Ainsi encore, en milieu liquide enrichi en filtrat de jeune culture d'antagoniste, l'action toxique s'exerçant (à 25°C) sur le mycélium en croissance de *P. oryzae* apparaît, à pH 4,1, supérieure ou au moins égale à celle notée à pH 6,0 (81 % d'inhibition à pH 4,1 contre 40 % à pH 6,0 pour *M. verrucaria* (N 76/1); 74 % contre 66 % pour *C. globosum* (N 76/1); 68 % contre 67 % pour *T. viride*) (SY, ALBERTINI et HAMANT, 1978a). D'autre part, l'application, à ces deux derniers pH, d'un test destiné à mesurer l'activité antigéminative des antagonistes (suspension aqueuse des conidies du pathogène mélangée à un égal volume de liquide de culture antagoniste ayant en suspension ses propres spores) a permis de mettre en évidence à 25°C (à l'obscurité) une patente efficacité de *C. globosum* (N 76/1), supérieure à pH 4,1 (98 % d'inhibition de germination des conidies de *P. oryzae*) qu'à pH 6,0 (81 %); dans des conditions externes analogues, alors que *M. verrucaria* (N 76/1) empêche toute germination aux deux pH, *T. viride* (N 76/5), faiblement actif, s'exprime un peu mieux à pH 6,0 (17 %) qu'à pH 4,1 (13 %) (SY, ALBERTINI et HAMANT, 1978b).

Des investigations complémentaires, portant sur de nouveaux microorganismes, en vue de la sélection d'antagonistes performants vis-à-vis de *P. oryzae*, nous ont conduit à juger de l'aptitude de ces microorganismes à neutraliser *in vitro* la croissance mycélienne du pathogène à trois valeurs du pH (4,1; 6,2; 7,2)

qui, selon l'un de nous (SY, 1976), autorisent, chez le pathogène témoin, une croissance mycélienne modérément active (pH 4,1) à active (pH 7,2) en passant par un optimum peu marqué (pH 6,2). La présente publication expose, en fonction du pH, les résultats concernant le comportement *in vitro* de dix neuf microorganismes (seize champignons, trois bactéries) vis-à-vis du mycélium en croissance de *P. oryzae*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) Matériel biologique

Le parasite est représenté par la souche Se3 de *P. oryzae*; les antagonistes, au nombre de 19, sont répertoriés et codifiés dans le tableau 1 récapitulatif.

B) Méthodes

La technique de confrontation directe sur milieu solide en boîtes de Petri ainsi que la méthode d'évaluation du taux d'inhibition de la croissance mycélienne en surface de *P. oryzae* par les antagonistes ont été exposées dans une publication antérieure (SY et col., 1978 a). Précisons cependant que la confrontation directe parasite-antagoniste est réalisée sur milieu PCA, le pH souhaité (4,1; 6,2 ou 7,2) étant obtenu grâce à l'adjonction de 20 % de tampon de McIlvaine (SY et col., 1978a); les valeurs de pH indiquées correspondent à celles stabilisées après stérilisation à 120 °C pendant 20 minutes. La confrontation est effectuée à 25 °C, à l'obscurité.

RÉSULTATS ET REMARQUES

L'examen analytique des résultats présentés au Tableau 1 permet de séparer les antagonistes étudiés en 3 groupes :

1) *Trichoderma harzianum* (CPO/80), *T. koningii* (N 70), *Fusarium* sp. (C 302 G), les bactéries (CS/C1 2) et (PTZ) se montrent efficaces aux trois pH expérimentés (niveau minimal : 59,7 % d'inhibition de *Pyricularia oryzae* (Se3) par *Fusarium* sp. (C302 G) à pH 6,2; niveau maximal : 100 % par *T. harzianum* (CPO/80) et par *T. koningii* à pH 4,1).

2) *T. pseudokoningii* (N 69), *Aspergillus niger*, *T. viride* (N 76/5), *T. harzianum* (N68) et (N 72), *Trichoderma* spp. (IKP/6) et (GX2), *Curvularia eragrostidis*, *P. oryzae* (μ) et *C. geniculata* provoquent, à pH 4,1, une inhibition de la croissance mycélienne de *P. oryzae* supérieure à 60 %; mais, à l'exception des deux premiers antagonistes nommés qui inhibent encore à plus de 60 % la croissance du pathogène à pH 6,2, ils se montrent assez peu efficaces à pH 6,2 et à pH 7,2.

3) Les quatre antagonistes restants sont les moins actifs, trois d'entre eux (*Chaetomium globosum* (N 76/1), *Myrothecium verrucaria* (N 76/1) et *Strept-*

TABLEAU 1

Expression numérique des résultats : mise en évidence des potentialités antagonistes de différentes souches fongiques et bactériennes par évaluation du taux d'inhibition relative (%) de la croissance mycélienne en surface de *Pyricularia oryzae* Cav. (souche Se3); confrontations directes (durée de 8 jours) sur PCA et pour trois pH repères.

TABLE 1

Antagonism between some strains of fungi and bacteria by evaluation of the rate of relative inhibition (%) of mycelial growth on *P. oryzae* Cav. (strain Se3); direct confrontations (8 days) on PCA and for 3 pH.

Germes antagonistes	pH	4,1	6,2	7,2
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (CPO/80)		100	88,2	65,0
<i>Trichoderma koningii</i> Oud. (N 70)		100	87,2	66,9
<i>Fusarium</i> sp. Link.:Fr. (C 302 G)		74,6	59,7	67,6
Bactérie CS/C1 2		73,5	66,5	64,0
Bactérie PTZ		69,2	80,9	71,5
<i>Trichoderma pseudokoningii</i> Rifai (N 69)		100	66,7	30,5
<i>Trichoderma viride</i> Pers.:Fr. (N 76/5)		100	33,5	16,1
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (N 72)		96,0	53,0	36,6
<i>Trichoderma</i> sp. Pers. (IKP/6)		95,2	47,2	28,9
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (N 68)		93,2	47,5	37,5
<i>Trichoderma</i> sp. Pers. (GX2)		85,0	48,5	22,0
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem		88,2	65,3	(*)
<i>Curvularia eragrostidis</i> (P. Henn.) J.A. Meyer		85,1	26,1	25,8
<i>Pyricularia oryzae</i> Cav. (μ)		78,8	13,9	(*)
<i>Curvularia geniculata</i> (Tracy et Earle) Boedijn		67,3	49,2	31,1
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze:Fr. (N 76/1)		59,7	42,5	41,5
<i>Myrothecium verrucaria</i> (Alb. et Schw.) Ditmar ex Fr. (N 76/1)		54,4	17,7	13,2
<i>Streptomyces antibioticus</i> (Wask. et Wood.) Wask. et Hen.		52,5	26,7	34,8
<i>Drechslera oryzae</i> (Breda de Haan) Subram. et Jain (N 80)		40,5	10,4	24,9

- Chaque taux d'inhibition est calculé à partir de mesures d'aires de colonies effectuées sur 12 boîtes de Petri.

- Croissance en surface du témoin *P. oryzae* Cav. (Se3) en 8 jours sur PCA, 25°C, obscurité : 10,20 cm² à pH 4,1; 26,18 cm² à pH 6,2 et 24,00 cm² à pH 7,2.

(*) Valeur non disponible.

- Each inhibition rate is calculated by measuring colony surface on 12 Petri dishes.

- Development of *P. oryzae* Cav. (Se3) surface, during 8 days on PCA, at 25°C, in the dark : 10,20 cm² at pH 4,1; 26,18 cm² at pH 6,2 and 24,00 cm² at pH 7,2.

(*) Value not available.

omyces antibioticus) étant cependant capables de provoquer, à pH 4,1 uniquement, une inhibition de croissance mycélienne de *P. oryzae* (Se3) comprise entre 50 % et 60 %.

Nous avons précédemment noté que *T. harzianum* et *T. viride*, agissant essentiellement par contact, ont, sur le mycélium d'*H. turcicum* mis à incuber à sa température optimale (25°C) sur milieu solide (PCA), une meilleure efficacité antagoniste à pH 4,4 qu'à pH 7,0 (91 % d'inhibition à pH 4,4 contre 62 % à pH 7,0 pour *T. harzianum*; 57 % à pH 4,4 contre 12 % à pH 7,0 pour *T. viride*); à 30°C pour ces deux pH, l'action à distance de *M. verrucaria*, champignon thermophile, prend le relais de l'action de contact de *T. viride* sans parvenir au niveau de celle de *T. harzianum* peu marquée par le pH à cette température (63 % à pH 4,4 contre 66 % à pH 7,0 pour *T. harzianum*; 50 % aux deux pH pour *M. verrucaria*; 7 % à pH 4,4 et 5 % à pH 7,0 pour *T. viride* qui montre une croissance très ralentie à 30°C) (MICKALA-DOUKAGA, ALBERTINI et PETITPREZ, 1978). De ces données et d'autres tirées de l'utilisation d'antagonistes moins thermophiles (tels que *Epicoccum purpurascens* appliqué à 14°C), il nous est apparu que, face au mycélium d'*H. turcicum*, l'action inhibitrice des antagonistes retenus telle qu'elle s'est exprimée dans cette expérimentation sur milieu solide (PCA) en fonction de la température (14°C, 25°C, 30°C) et du pH (4,4; 5,5; 7,0) est principalement une fonction croissante de leur aptitude à se développer, cette action semblant, en revanche, assez peu dépendante du rythme de développement d'*H. turcicum* dans ces conditions expérimentales (MICKALA-DOUKAGA et col., 1978).

Dans un autre précédent travail relatif à l'action d'antagonistes sur le mycélium en croissance de *P. oryzae* (SY et col., 1978 a) et dont certains résultats sont rappelés dans l'introduction de la présente note, nous avons montré, par application de différentes méthodes de confrontation antagoniste-parasite que trois antagonistes présélectionnés (*C. globosum* (N76/1), *M. verrucaria* (N 76/1) et *T. viride* (N 76/5)) se montrent à 25°C (température proche de celle autorisant la croissance mycélienne optimale de *P. oryzae*) plus actifs à pH bas (3,5-4,1) qu'à pH moins acide (5,6-6,2). Concernant ces trois antagonistes, nous avons retrouvé, dans l'expérimentation ici présentée, leur capacité inhibitrice mieux exprimée à pH 4,1 qu'aux pH 6,2 et 7,2 (Tableau 1).

D'ailleurs, de façon générale, nous observons que les taux d'inhibition induits par les champignons antagonistes, que ceux-ci soient très actifs ou peu efficaces, sont plus élevés à pH nettement acide (4,1) qu'à pH faiblement acide (6,2) ou proche de la neutralité (7,2) (Tableau 1). Nous pensons que, face aux antagonistes fongiques, la plus forte réduction de croissance mycélienne de *P. oryzae* notée à pH 4,1 qu'à pH 6,2 ou 7,2 s'explique par la conjugaison de deux faits s'exerçant dans le même sens :

1) un meilleur développement mycélien de la plupart des antagonistes fongiques expérimentés à pH modérément acide qu'à pH neutre (observations de SY non publiées),

2) une activité végétative de *P. oryzae* relativement plus faible à pH 4 qu'à pH 6 ou 7 (SY et col., 1978 a). Nous retrouvons dans la confrontation champignons antagonistes - *P. oryzae*, le caractère de l'activité des antagonistes fongiques notés comme efficaces face à *H. turcicum*, à savoir que cette activité s'exprime d'autant mieux que l'antagoniste trouve les conditions (de pH notam-

ment : 4,1 pour les antagonistes fongiques confrontés au mycélium de *P. oryzae*) favorables à sa croissance : si de telles conditions sont de plus, défavorables au développement du pathogène (c'est le cas pour *P. oryzae* à pH 4,1), l'effet antagoniste ne s'exerce que mieux.

Face à *P. oryzae*, le comportement des deux bactéries antagonistes efficaces (CS/Cl2 et PTZ) est quelque peu différent de celui des champignons antagonistes (Tableau 1) : ces deux bactéries s'expriment, par émission de composés antibiotiques, avec une comparable efficacité aux trois pH expérimentés. En relation avec le meilleur développement de leurs colonies à pH 6,2 ou 7,2 qu'à pH 4,1 (observations de SY non publiées), ces deux bactéries contrent donc relativement mieux que les champignons antagonistes le mycélium en croissance du pathogène à un pH neutre ou faiblement acide pourtant plus favorable à la croissance du pathogène qu'un pH nettement acide.

Dans la présente publication, ainsi que dans la précédente consacrée à l'action du facteur température sur l'activité *in vitro* de nouveaux germes fongiques et bactériens que nous avons sélectionnés en vue de lutter, par voie biologique, contre *P. oryzae* (le plus redoutable pathogène du riz), notre expérimentation n'a porté que sur la confrontation antagoniste-mycélium en croissance du parasite. Nous devons, dans une seconde étape, estimer l'influence de ces antagonistes potentiels sur la formation et surtout sur la germination de conidies de *P. oryzae* : l'inhibition *in vitro* du phénomène de germination, jointe à celle (obtenue, comme nous venons de le voir) de la croissance mycélienne serait de bon augure pour un contrôle convenable *in vivo* des contaminations et de l'installation parasitaires. Il est, en effet, encourageant de savoir que, dans plusieurs cas de parasitisme aérien, les observations satisfaisantes effectuées *in vivo* par les auteurs sur des pathogènes variés (DAS et PAL, 1968 : *Alternaria solani* sur feuilles de pomme de terre; KAPOORIA et SINHA, 1969 : *Puccinia penniseti* sur feuilles de mil; MISHRA et TEWARI, 1976 : *Puccinia graminis tritici* sur feuilles de blé; NORNG, 1979 : *Botrytis cinerea* sur grappes de raisin; MOUSTAFA, 1982 : *Helminthosporium teres* sur limbes d'orge) confrontés à des antagonistes fongiques et/ou bactériens, ont confirmé les résultats positifs établis *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

- AYTOUN R.C.S., 1953 - The genus *Trichoderma* : its relationship with *Armillaria mellea* (Vahl ex Fries) Quél. and *Polyporus Schweinitzii* Fr. together with preliminary observations on its ecology in woodland soils. *Trans. Proc. bot. Soc.*, Edinburg, 36 : 99-113.
- DAS C.R. et PAL A., 1968 - Influence of *Rhizopus nigricans* Ehrenb. on the development of *Alternaria solani* (Ell. et Mart.) Jones et Grout. *Phytopath. Z.* 63 : 40-46.
- DENNIS C. et WEBSTER J., 1971 ■ - Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. mycol. Soc.* 57 : 25-39.

- KAPOORIA R.G. et SINHA S., 1969 — Phylloplane mycoflora of pearl millet and its influence on the development of *Puccinia penniseti*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 53 : 153-155.
- MICKALA-DOUKAGA E., ALBERTINI L. et PETITPREZ M., 1978 — Action *in vitro* d'antagonistes fongiques sur la croissance mycélienne de l'*Helminthosporium turcicum* Pass. parasite du maïs. Note préliminaire. *Bull. Soc. Myc. Fr.* 94 : 33-47.
- MISHRA R.R. et TEWARI R.P., 1976 — Studies on biological control of *Puccinia graminis tritici*. Dans : Microbiology of aerial plant surfaces, DICKINSON C.H. et PREECE T.F. édité., Acad. Press, Londres, New-York et San Francisco : 559-567.
- MOUSTAFA M.M.M., 1982 — Recherches sur la lutte biologique contre l'*Helminthosporium teres* Sacc., parasite de l'orge (*Hordeum sativum* Jessen) par l'utilisation de micro-organismes antagonistes et d'une souche pathogène hypoagressive. Thèse Docteur-Ingénieur, n° 220, Institut National Polytechnique, Toulouse, France.
- NORNG K., 1979 — Recherches sur la lutte biologique contre le *Botrytis cinerea* Pers., parasite de la vigne, par utilisation d'antagonistes fongiques. Études principalement *in vitro*. Thèse Docteur-Ingénieur, n° 72, Institut National Polytechnique, Toulouse, France.
- NORNG K., ALBERTINI L. et SY A.A., 1981 — Résultats non publiés.
- SY A.A., 1976 — Contribution à l'étude de *Pyricularia oryzae* Cav.; morphologie, biologie et physiologie. Recherches *in vitro* d'antagonistes dans une perspective de lutte biologique. Thèse Docteur-Ingénieur, n° 534, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- SY A.A., ALBERTINI L. et HAMANT Cl., 1978 a — Recherches sur la lutte biologique contre le *Pyricularia oryzae* Cav. I - Action *in vitro* d'antagonistes fongiques sur la croissance mycélienne du parasite. *Rev. gén. Bot.*, 85 : 63-81.
- SY A.A., ALBERTINI L. et HAMANT Cl., 1978 b — Recherches sur la lutte biologique contre le *Pyricularia oryzae* Cav. II - Action *in vitro* d'antagonistes fongiques sur la germination des conidies du parasite. *Rev. gén. Bot.* 85 : 83-90.